

**Tetracycline promoter for the stringently regulated production of recombinant proteins in prokaryotic cells**

Veröffentlichungsnr. (Sek.) ☐ US5849576  
Veröffentlichungsdatum : 1998-12-15  
Erfinder : SKERRA ARNE [DE]; WARDENBERG CHRISTINA [DE]  
Anmelder : MAX PLANCK GESELLSCHAFT  
Veröffentlichungsnummer : ☐ DE4417598  
Aktenzeichen:  
(EPIDOS-INPADOC-normiert) US19960737316 19961112  
Prioritätsaktenzeichen:  
(EPIDOS-INPADOC-normiert) DE19944417598 19940519; WO1995EP01862 19950517  
Klassifikationssymbol (IPC) : C12N15/63; C12N15/64; C12N15/70  
Klassifikationssymbol (EC) : C07K16/00, C12N15/63A, C12N15/70  
Korrespondierende Patentschriften ☐ EP0759997 (WO9532295), B1, ☐ WO9532295

---

**Bibliographische Daten**

---

PCT No. PCT/EP95/01862 Sec. 371 Date Nov. 12, 1996 Sec. 102(e) Date Nov. 12, 1996 PCT Filed May 17, 1995 PCT Pub. No. WO95/32295 PCT Pub. Date Nov. 30, 1995 The present invention concerns a prokaryotic vector which contains a regulatable expression control sequence that can be repressed by the repressor of the tetracycline resistance gene, a prokaryotic cell transformed with this vector and the use of the vector or the cell in a process for the production of polypeptides in prokaryotes by genetic engineering.

---

Daten aus der **esp@cenet** Datenbank - - I2



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Off nl gungsschrift**  
⑩ **DE 44 17 598 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**C 12 N 15/70**  
C 12 N 1/21  
C 07 K 14/245  
// (C12N 1/21, C12R  
1:19)

②1 Aktenzeichen: P 44 17 598.1  
②2 Anmeldetag: 19. 5. 94  
④3 Offenlegungstag: 14. 12. 95

DE 44 17 598 A 1

⑦1 Anmelder:  
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der  
Wissenschaften eV, 14195 Berlin, DE  
  
⑦4 Vertreter:  
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑦2 Erfinder:  
Skerra, Arne, Dr., 65187 Wiesbaden, DE;  
Wardenberg, Christina, 60528 Frankfurt, DE

- ⑤4 Verwendung des Tetracyclinpromotors zur stringent regulierten Produktion von rekombinanten Proteinen in prokaryontischen Zellen
- ⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft einen prokaryontischen Vektor, der eine regulierbare Expressionskontrollsequenz enthält, die durch den Repressor des Tetracyclin-Resistenzgens reprimierbar ist, eine mit diesem Vektor transformierte prokaryontische Zelle und die Verwendung des Vektors oder der Zelle in einem Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Polypeptiden in Prokaryonten.

DE 44 17 598 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 10. 95 508 050/16

21/31

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen prokaryontischen Vektor, der eine regulierbare Expressionskontrollsequenz enthält, die durch den Repressor des Tetracyclin-Resistenzgens reprimierbar ist, eine mit diesem Vektor transformierte prokaryontische Zelle und die Verwendung des Vektors oder der Zelle in einem Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Polypeptiden in Prokaryonten.

Zur Produktion heterologer Proteine in *E. coli* haben sich induzierbare Promotorsysteme als sehr geeignet erwiesen, da eine Synthese des rekombinanten Genprodukts oft eine toxische Wirkung für die Bakterienzelle zeigt, wodurch deren Wachstum und Lebensfähigkeit beeinträchtigt wird. Insbesondere bei Sekretion des Fremdproteins in den periplasmatischen Raum der Wirtszelle ist es empfehlenswert, eine strenge Repression des Promotors nicht nur im Verlauf der Arbeiten zur Herstellung des Vektors sicherzustellen, sondern auch um hohe Zelldichten mit den transformierten Bakterien vor der eigentlichen Proteinproduktion zu erreichen. Die bakterielle Sekretion von Antikörperfragmenten ist ein typisches Beispiel in dieser Hinsicht, da aufgrund der heterologen Genexpression eine toxische und lytische Wirkung auf die Bakterienzelle beobachtet wird (Plückthun und Skerra, *Methods Enzymol.* 178 (1989), 497—515).

Ein besonders häufig verwendetes induzierbares Promotorsystem ist der durch Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbare lac-Promotor und seine Derivate, z. B. die Mutante lacUV5 oder der tac-Fusionspromotor (Reznikoff und Gold (1986), In: *Maximizing gene expression*, Butterworth Publishers, Stoneham, MA). Die Verwendung des lac-Promotors zur gentechnischen Herstellung von Antikörperfragmenten in Bakterien ist beispielsweise bei Skerra (Dissertation, LMU München, Fakultät für Chemie und Pharmazie, 1983) beschrieben.

Die Stärke der Transkription vom lac-Promotor ist jedoch mit dem Genotyp und dem Stoffwechsel der Wirtszelle über die endogene Konzentration von lac-Repressormolekülen einerseits und über die Katabolit-Repressionswirkung andererseits gekoppelt. Man beobachtet daher bei Verwendung eines lac-Expressionssystems erhebliche Variationen der Expressionsstärke mit einem gegebenen Vektor in Abhängigkeit vom verwendeten Wirtstamm. Dies kann entweder auf eine verringerte Induzierbarkeit zurückzuführen sein — insbesondere, wenn der lac-Repressor sowohl chromosomal als auch Plasmid-kodiert ist und daher in zu hohen Mengen vorliegt — oder auf ein Absterben der Zellen bzw. einen Plasmidverlust vor der Induktion aufgrund unzureichender Repression.

Außer dem lac-Promotor sind auch andere regulierbare Promotorsysteme verwendet worden, die meisten davon weisen jedoch erhebliche Nachteile auf, insbesondere wenn eine moderate Sekretion des Fremdgenprodukts oder eine Expression bei verringerter Temperatur zur Begünstigung des Proteinfaltungsprozesses gewünscht wird. Daher besteht ein großes Bedürfnis nach der Bereitstellung einer prokaryontischen Expressionskontrollsequenz, die von individuellen Eigenschaften der bakteriellen Wirtszelle weitgehend entkoppelt ist und die auf einfache und kostengünstige Weise reversibel induzierbar ist.

In einer Arbeit von De la Torre et al. (Plasmid 12 (1984), 103—110) werden Plasmidvektoren beschrieben, in denen die Genexpression durch Tetracyclin partiell reguliert wird. Diese Vektoren enthalten die regulatorische Region des Tetracyclin-Resistenzgens aus dem Transposon Tn10. Diese Region bewirkt ursprünglich die Expression des Tetracyclin-Resistenzgens in einer Richtung und die Expression des Tetracyclin-Repressorstrukturgens in die andere (Bertrand et al., *Gene* 23 (1983), 149—156). Das Tetracyclin-Repressorprotein unterbindet bei Wechselwirkung mit dem Operator die Expression in beiden Richtungen und unterliegt damit der Autoregulation. Die Repression eines Fremdgens anstelle des Tetracyclin-Resistenzgens unter Kontrolle dieses Tetracyclin-Promotors erfolgte durch Kotransformation mit einem kompatiblen Plasmid, welches das Tetracyclin-Repressorgen ebenfalls unter Kontrolle des Tetracyclin-Promotors enthält. In Wirtszellen, welche diese beiden Plasmide enthalten, konnte bei Abwesenheit von Tetracyclin eine bis zu 8-fache Repression der Expression eines Fremdgens gefunden werden. Eine derartige geringe Repression ist für die gentechnische Herstellung von Proteinen mit für die Bakterienzelle toxischer Wirkung völlig unzureichend, so daß dieses System bis heute keinerlei praktische Anwendung gefunden hat.

Eine der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht darin, ein Expressionsvektorsystem zur Herstellung rekombinanter Proteine in prokaryontischen Organismen bereit zustellen, bei dem die Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise beseitigt sind.

Diese Aufgabe wird gelöst durch Bereitstellung eines prokaryontischen Vektors, umfassend (a) eine regulierbare Expressionskontrollsequenz, die durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbar ist und (b) ein Tetracyclin-Repressorstrukturgen in operativer Verknüpfung mit einer Expressionskontrollsequenz, die nicht durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbar ist.

Der erfindungsgemäße Vektor unterscheidet sich von dem aus dem Stand der Technik bekannten Tetracyclin-Expressionssystem dadurch, daß der Tetracyclin-Repressor unter Kontrolle eines unabhängigen Promotors gestellt ist und somit seine eigene Synthese nicht mehr kontrollieren kann. Dadurch wird überraschenderweise eine drastisch verbesserte Repression bei der Expression eines Fremdgens unter Kontrolle der regulierbaren Expressionskontrollsequenz erreicht. Vorzugsweise befindet sich ein Tetracyclin-Repressorstrukturgen, z. B. das Tetracyclin-Repressorgen aus dem Transposon Tn10 (Bertrand et al., *Gene* 23 (1983), 149—156), auf dem erfindungsgemäßen Vektor in operativer Verknüpfung mit einer konstitutiven Expressionskontrollsequenz, d. h. mit einer nicht-regulierbaren Expressionskontrollsequenz, beispielsweise mit dem Promotor des für die Resistenz gegen Ampicillin verantwortlichen  $\beta$ -Lactamasegens.

Das erfindungsgemäße Tetracyclin-Expressionssystem zeigt im nicht-induzierten Zustand eine erheblich bessere Repression als das lac-Expressionssystem. Dies zeigt sich in einem erheblich besseren Wachstumsverhalten und in einer erhöhten Lebensfähigkeit von Bakterien, die mit einem Gen transformiert sind, das für ein für den Wirtsorganismus toxisches Polypeptid kodiert, wie z. B. ein Antikörperfragment. Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Expressionssystems besteht darin, daß die Expression eines heterologen Polypeptids in den

unterschiedlichsten E.coli-Wirtsstämmen nahezu identisch ist. Darüber hinaus wurde auch kein signifikanter Einfluß des Nährmediums auf die Expression des heterologen Polypeptids beobachtet. Diese Vorteile des erfindungsgemäßen Expressionssystems sind bereits bei Versuchen im Labormaßstab deutlich erkennbar, sie treten jedoch noch in erheblich größerem Umfang bei Versuchen im Fermenter-Maßstab auf. Das erfindungsgemäße Expressionssystem kann daher erfolgreich zur rekombinanten Herstellung von Polypeptiden unter industriellen Bedingungen eingesetzt werden. 5

Der erfindungsgemäße Vektor ist ein prokaryontischer Vektor, d. h. ein Vektor, der zur Propagierung in einer prokaryontischen Wirtszelle fähig ist. Beispiele für derartige Vektoren sind Plasmidvektoren, Bakteriophage Lambda-Vektoren, Cosmidvektoren und einzelsträngige, filamentöse Bakteriophagenvektoren (vgl. Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Kap. 1—4 und 17). Vorzugsweise ist der erfindungsgemäße Vektor ein zirkuläres Plasmid, insbesondere ein Multi-Copy-Plasmid, das in mehr als 10 Kopien in der Wirtszelle vorliegt. Der Plasmidvektor weist einen für die jeweilige prokaryontische Wirtszelle geeigneten Replikationsursprung auf, z. B. für E.coli einen ColE1- oder p15A-Replikationsursprung. Weiterhin enthält der erfindungsgemäße Vektor vorzugsweise ein Antibiotikumresistenzgen, z. B. ein Ampicillin-, Kanamycin- oder Chloramphenicol-Resistenzgen, um eine Selektion auf Wirtszellen zu ermöglichen, welche den Vektor enthalten. 10 15

Der erfindungsgemäße Vektor enthält eine regulierbare Expressionskontrollsequenz, die durch den Repressor des Tetracyclin-Resistenzgens reprimierbar ist. Der Tetracyclin-Repressor ist ein Protein, das in Abwesenheit von Tetracyclin oder Tetracyclinderivaten an den regulatorischen Bereich der Tetracyclin-Promotorregion bindet und die Expression durch diesen Promotor reprimiert. In Anwesenheit von Tetracyclin oder Tetracyclinderivaten wird die Repressorwirkung aufgehoben (Degenkolb et al., Antimicrob. Agents Chemother. 35 (1991), 1591—1595). 20

Vorzugsweise enthält die durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbare Expressionskontrollsequenz des erfindungsgemäßen Vektors die in SEQ ID NO. 1 dargestellte Nukleotidsequenz oder eine funktionelle Variante davon. Die in SEQ ID NO. 1 dargestellte Nukleotidsequenz entspricht den Nukleotiden 19 bis 101 in Fig. 2a. Der Begriff "funktionelle Variante" bedeutet, daß die Expressionskontrollsequenz mindestens eine, vorzugsweise zwei funktionelle Tetracyclin-Repressor-Bindestellen enthält, die z. B. zwischen den Positionen —35 und —10 oder +1 bis +19 der Expressionskontrollsequenz (bezüglich der Transkriptionsstartstelle) angeordnet sein können (vgl. Fig. 2a). 25

Die regulierbare Expressionskontrollsequenz des erfindungsgemäßen Vektors enthält als funktionelle Tetracyclin-Repressor-Bindestellen besonders bevorzugt die palindromen Abschnitte zwischen den Nukleotiden —31 bis —13 oder/und +1 bis +19 (bezüglich der Transkriptionsstartstelle) der in SEQ ID NO. 1 und Fig. 2a gezeigten Nukleotidsequenz mit den Basenfolgen 5'-ACTCTATCATTGATAGAGT-3' und 5'-TCCCTATCAGTGATAG-3' oder DNA-Sequenzen mit äquivalenten Bindungseigenschaften für den Tetracyclin-Repressor. 30 35

Weiterhin umfaßt der erfindungsgemäße Vektor vorzugsweise eine multiple Klonierungsstelle in operativer Verknüpfung mit der durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbaren Expressionskontrollsequenz. In diese multiple Klonierungsstelle, die auch als Polylinker bezeichnet wird und vorzugsweise mehrere für den jeweiligen Vektor singuläre Restriktionsschnittstellen enthält, können Fremdgene einkloniert werden, die durch das erfindungsgemäße Expressionssystem exprimiert werden sollen. 40

Der erfindungsgemäße Vektor kann auch eine Signalpeptid-kodierende Sequenz umfassen, die in operativer Verknüpfung mit der durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbaren Expressionskontrollsequenz ist. Beispiele für geeignete Signalsequenzen sind die OmpA- und die PhoA-Signalsequenzen. Weitere geeignete Signalsequenzen werden beispielsweise von Winnacker in Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie (1985), VCH-Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, auf den Seiten 254 ff. bzw. von Watson "Compilation of published signal sequences" Nucl. Acids Res. 12 (1984), 5145—5164 beschrieben. 45

Durch Fusionierung der Signalpeptid-kodierenden Sequenz mit einem in den Vektor inserierten Fremdgen wird eine Sekretion des vom Fremdgen kodierten Genprodukts in das Periplasma der Wirtszelle unter Abspaltung des Signalpeptids erreicht.

Weiterhin umfaßt der erfindungsgemäße Vektor vorzugsweise eine Transkriptionsterminationssequenz in operativer Verknüpfung mit der durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbaren Expressionskontrollsequenz, wobei die Transkriptionsterminationssequenz, beispielsweise der Lipoprotein-Transkriptionsterminator, auf dem erfindungsgemäßen Vektor derart angeordnet ist, daß die Transkription eines unter Expressionskontrolle des Tetracyclin-Promotors transkribierten Gens am Terminator endet. 50

Um die Reinigung eines heterologen Polypeptids zu erleichtern, welches durch das Tetracyclin-Expressionssystem erzeugt wird, kann der erfindungsgemäße Vektor weiterhin eine für ein Affinitätspeptid kodierende Nukleotidsequenz in operativer Verknüpfung mit der durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbaren Expressionskontrollsequenz umfassen. Die für das Affinitätspeptid kodierende Sequenz ist im erfindungsgemäßen Vektor zweckmäßigerweise derart lokalisiert, daß sie mit dem C-Terminus eines in den Vektor inserierten Fremdgens fusioniert wird. Beispiele für geeignete Affinitätspeptide sind ein Oligo-Histidin-Peptid, insbesondere eine Sequenz von 5 oder 6 aufeinanderfolgenden Histidin-Resten, das eine Reinigung von bakteriell exprimierten Fremdproteinen durch Metallchelat-Affinitätschromatographie erlaubt (Hochuli et al., Bio/Technology (1988), 1321—1325), oder ein Streptavidin-Bindungspeptid (Schmidt und Skerra, Protein Eng. 6 (1993), 1093-122), das eine Reinigung des Fremdproteins durch Affinitätschromatographie mit Streptavidin-Agarose unter Verwendung von sehr milden Elutionsbedingungen gestattet. Ein besonders bevorzugtes, auch als "Strep-tag" bezeichnetes Streptavidin-Bindungspeptid weist die Aminosäuresequenz Ser—Ala—Trp—Arg—His—Pro—Gln—Phe—Gly—Gly auf. 55 60 65

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens ein für ein heterologes

Polypeptid kodierendes Fremdgen in operativer Verknüpfung mit der durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbaren Expressionskontrollsequenz enthält. Gegebenenfalls kann das Fremdgen als Fusion mit einer Signalpeptid-kodierenden Sequenz oder/und einer Affinitätspeptid-kodierenden Sequenz vorliegen. Der Begriff "heterolog" bedeutet, daß das Fremdgen weder für das Tetracyclin-Resistenzprotein noch für das Tetracyclin-Repressorprotein kodiert. Vorzugsweise kodiert das Gen für ein Polypeptid, das für eine prokaryontische Zelle toxisch ist und dessen Expression im nicht-induzierten Zustand möglichst gering gehalten werden muß. Beispiele für derartige toxische Produkte sind Antikörperfragmente. Das erfindungsgemäße Expressionssystem ist jedoch nicht nur für die genannten Beispiele, sondern generell zur Expression beliebiger Proteine, insbesondere Säugerproteine, einsetzbar.

Der erfindungsgemäße Vektor kann auch mehrere Fremdgene unter Kontrolle eines Tetracyclin-Promotors enthalten. Ein Beispiel hierfür ist der Expressionsvektor pASK85-D1.3 (vgl. Fig. 3), der die Gene für die schwere und die leichte Kette eines Antikörper-Fab-Fragments unter Kontrolle des Tetracyclin-Promotors enthält.

Ein besonders bevorzugtes Beispiel für einen erfindungsgemäßen Vektor ist das Plasmid pASK75, welches das in Fig. 1a und SEQ ID NO. 2 angegebene Nukleotidsequenz aufweist und in Fig. 1b schematisch dargestellt ist. Dieses Plasmid enthält als genetische Elemente einen ColEI-DNA-Replikationsursprung (ori), das  $\beta$ -Lactamasegen (bla), das Strukturgen des Tetracyclin-Repressors (tetR) unter Kontrolle des  $\beta$ -Lactamasepromotors, die intergenische Region des filamentösen Phagen f1 (f1-IG), die Promotor/Operator-Region des Tetracyclin-Resistenzgens aus dem Transposon Tn10 (tetP/O), eine für das OmpA-Signalpeptid kodierende DNA-Sequenz, einen Polylinker, eine für das Streptavidin-Bindungspeptid kodierende DNA-Sequenz (Strep-tag) und den Lipoprotein-Transkriptionsterminator ( $t_{pp}$ ). Diese genetischen Elemente stehen miteinander in operativer Verknüpfung, so daß bei geeigneter Inserierung eines Fremdgens in den Polylinker ein Expressionsvektor bereitgestellt wird, der eine effiziente Expression von Fremdgenen in prokaryontischen Wirtszellen ermöglicht, selbst wenn die vom Fremdgen kodierten Polypeptide ein für die Zelle toxisches Genprodukt darstellen.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine prokaryontische Zelle, enthaltend (a) ein für ein heterologes Polypeptid kodierendes Gen in operativer Verknüpfung mit einer regulierbaren Expressionskontrollsequenz, die durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbar ist, und (b) ein Tetracyclin-Repressorgen in operativer Verknüpfung mit einer Expressionskontrollsequenz, die nicht durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbar ist. Vorzugsweise ist diese Zelle mit mindestens einer Kopie eines erfindungsgemäßen Vektors transformiert. Vorzugsweise ist die prokaryontische Zelle eine gram-negative Zelle, besonders bevorzugt eine Enterobakterienzelle (z. B. Salmonella, Escherichia) und am meisten bevorzugt eine E.coli-Zelle.

Der erfindungsgemäße Vektor und die erfindungsgemäße Zelle können in einem Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Polypeptiden in Prokaryonten verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Polypeptiden in einer prokaryontischen Zelle, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- (i) eine Zelle bereitstellt, enthaltend (a) mindestens ein für ein heterologes Polypeptid kodierendes Gen in operativer Verknüpfung mit einer regulierbaren Expressionskontrollsequenz, die durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbar ist, und (b) ein Tetracyclin-Repressorstrukturgen in operativer Verknüpfung mit einer Expressionskontrollsequenz, die nicht durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbar ist,
- (ii) die Zelle aus (i) in einem geeigneten Medium unter Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression des für das heterologe Polypeptid kodierenden Gens führen, und
- (iii) das heterologe Polypeptid aus der Zelle oder dem Medium isoliert.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann so durchgeführt werden, daß man eine Wirtszelle verwendet, die die regulierbare Expressionskontrollsequenz und das Tetracyclin-Repressorgen — wie zuvor beschrieben — auf einem einzigen Vektor enthält. Andererseits kann man natürlich auch eine Wirtszelle verwenden, in der sich die regulierbare Expressionskontrollsequenz und das Tetracyclin-Repressorgen nicht auf einem einzigen Vektor befinden, z. B. auf zwei unterschiedlichen, miteinander kompatiblen Vektoren. Noch eine weitere Möglichkeit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, eine Wirtszelle zu verwenden, die einen Vektor mit dem Fremdgen unter Kontrolle des Tetracyclin-Promotors und eine episomale oder chromosomale Kopie des Tetracyclin-Repressorgens unter Kontrolle eines unabhängigen, nicht durch den Repressor reprimierbaren Promotors enthält.

Die Kultivierung der Zelle in Schritt (ii) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird vorzugsweise auf solche Weise durchgeführt, daß bis zum Erreichen einer vorbestimmten Zelldichte die Expression des für das heterologe Polypeptid kodierenden Gens weitgehend reprimiert ist, d. h. in Abwesenheit eines Induktors für die regulierbare Expressionskontrollsequenz, und daß erst nach Erreichen der vorbestimmten Zelldichte die Expression des Fremdgens induziert wird. Bei einer vollständigen Induktion der Expressionskontrollsequenz kann eine maximale Expression von für die Zelle toxischen Genprodukten erreicht werden. Andererseits kann durch Zugabe von geringen Mengen des Induktors eine in manchen Fällen wünschenswerte nur teilweise Induktion der Expressionskontrollsequenz erreicht werden.

Die Induzierung der regulierbaren Expressionskontrollsequenz erfolgt vorzugsweise durch Zugabe von Tetracyclin oder einem Tetracyclin-Derivat als Induktor. Die Zugabe des Induktors bewirkt, daß die Reprimierung der regulierbaren Expressionskontrollsequenz durch das Tetracyclin-Repressorprotein aufgehoben wird.

Als Induktor wird vorzugsweise Anhydrotetracyclin verwendet. Diese Verbindung ist eine kommerziell erhältliche Substanz, die bereits bei extrem geringen Konzentrationen von beispielsweise 5 bis 500  $\mu$ g Induktor pro Liter Medium wirksam ist und darüber hinaus geringere antibiotische Wirkung zeigt (Oliva et al., Antimicrob. Agents Chemother. 36 (1992), 913—919). Daher ist die Verwendung von Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivaten als Induktor auch wirtschaftlicher als die Verwendung von IPTG bei einem Expressionssystem auf Basis

des lac-Promotors.

Für eine vollständige Induktion sind Konzentrationen von 100 bis 250 µg/l Anhydrotetracyclin bevorzugt. Für eine teilweise Induktion sind Konzentrationen von 10 bis 50 µg/l Anhydrotetracyclin bevorzugt.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die gentechnische Herstellung von Polypeptiden mit dem Tetracyclin-Expressionssystem auch in einem Minimalmedium, z. B. einem Glucose-Minimalmedium (vgl. Sambrook et al. (1989), supra, Seite A3) mit hoher Effizienz durchgeführt werden kann. Vorzugsweise werden Minimalmedien verwendet, die neben mineralischen Bestandteilen (z. B. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) 0,1 bis 10%, besonders bevorzugt 1 bis 7% und am meisten bevorzugt 2 bis 5% einer C-Quelle auf Gewichtsbasis enthalten.

Der Einsatz von Minimalmedien beim erfindungsgemäßen Verfahren kann einerseits derart erfolgen, daß ein Nährmedium mit der gesamten gewünschten Menge der C-Quelle vorgelegt wird, in dem die Zellen dann kultiviert werden. Andererseits kann ein Teil der C-Quelle auch später während der Fermentation zudosiert werden, wobei diese Zudosierung vorzugsweise in Abhängigkeit vom Zellwachstum geregelt wird. Eine ausführliche Beschreibung der Kultivierung von transformierten Bakterienzellen in Minimalmedien findet sich bei Riesenberg (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 380—384). Auf die in dieser Literaturstelle beschriebenen Arbeitstechniken wird hiermit Bezug genommen.

Die Erfindung wird weiterhin durch nachfolgende Beispiele, Figuren und Sequenzprotokolle erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1a die vollständige Nukleotidsequenz des Plasmids pASK75 in doppelsträngiger Form einschließlich der Restriktionsstellen,

Fig. 1b eine schematische Darstellung des Vektors pASK75,

Fig. 2a die Nukleotidsequenz der gesamten regulatorischen Region auf pASK75,

Fig. 2b die künstlich hergestellte intercistronische Region zwischen dem bla-Gen und dem tetR-Strukturgen auf pASK75,

Fig. 3 eine schematische Darstellung des Vektors pASK85-D1.3,

Fig. 4a den Zeitverlauf der Induktion der Synthese eines Antikörper-Fab-Fragments unter Kontrolle eines Tetracyclin-Promotors und

Fig. 4b die Abhängigkeit der Synthese des Antikörper-Fab-Fragments vom Wirtstamm,

SEQ ID NO. 1 die Nukleotidsequenz des Tetracyclin-Promotor/Operatorbereichs (entsprechend den Nukleotiden 19 bis 101 in Fig. 2a) und

SEQ ID NO. 2 die vollständige Nukleotidsequenz des Plasmids pASK75.

#### Beispiele

##### Beispiel 1

#### Vektorkonstruktion

Der in Fig. 1a und Fig. 1b dargestellte Vektor pASK75, der den Tetracyclin-Promotor/Operatorbereich und das Tetracyclin-Repressorgen enthält, wurde aus dem lac-Promotorplasmid pASK60-Strep (Schmidt und Skerra, Protein. Eng. 6 (1993), 109—122) hergestellt. Die Expressionskassette von pASK75 (die zwischen den XbaI- und HindIII-Restriktionsstellen gelegene DNA-Sequenz, vgl. Fig. 2a) ist identisch wie bei pASK60-Strep und besteht aus einem Genfragment, das für das OmpA-Signalpeptid mit seiner Translationsinitiationsstelle kodiert, einem Polylinker und der für das Streptavidin-Bindungspeptid Strep-tag kodierenden Region.

Die Konstruktion von pASK75 aus pASK60-Strep erfolgte unter Verwendung von Standardmethoden (Sambrook et al. (1989), supra). Zunächst wurde das gesamte Segment auf pASK60-Strep, welches das lacI-Gen und den lac-Promotor/Operator enthielt, durch ein kurzes Fragment aus pWH1012 (Sizemore et al., Nucl. Acids Res. 18 (1990), 2875—2880) mit der Tetracyclin-Promotorregion ersetzt. Das doppelte Methionincodon am 5'-Ende des tetR-Leserahmens wurde zusammen mit der ursprünglich direkt anschließend gelegenen XbaI-Restriktionsstelle entfernt. Das tetR-Strukturgen, das dem Plasmid pWH520 (Berens et al., J. Biol. Chem. 267 (1992), 1945—1952) entnommen wurde, wurde direkt stromabwärts des modifizierten translationalen Stoppkodons für das β-Lactamasegen inseriert. Die XbaI-Restriktionsstelle am Beginn der kodierenden Region wurde durch Mutagenese eliminiert. Stromabwärts des tetR-Leserahmens wurde eine singuläre SpeI-Restriktionsstelle eingeführt und die Eco47III-Stelle im tetR-Strukturgen sowie eine AseI-Stelle im β-Lactamasegen wurden entfernt.

Die Nukleotidsequenz und die Restriktionsstellen in pASK75 sind in Fig. 1a gezeigt. Die Lokalisierung der genetischen Elemente auf pASK75 ist schematisch in Fig. 1b dargestellt. tetP/O ist die Promotor/Operator-Region, Strep-tag ist die für ein Streptavidin-Bindungspeptid kodierende Nukleotidsequenz, tpp ist der Lipoprotein-Transkriptionsterminator, bla das β-Lactamasegen, tetR das Strukturgen des tet-Repressors, ori ein ColEI-Replikationsursprung, f1-IG die intergenische Reaktion aus dem filamentösen Phasen f1. Weiterhin sind in Fig. 1b die singulären Restriktionsstellen für XbaI und HindIII, welche die Expressionskassette flankieren, sowie die zur Insertion von Fremdgenen zwischen der OmpA-Signalsequenz und dem Strep-tag-Affinitätspeptid bevorzugt geeigneten Restriktionsstellen angegeben.

pASK75 enthält eine Tandem-Ribosomen-Bindestelle für eine effiziente Translationsinitiation. Ein Strukturgen kann mit der OmpA-Signalsequenz (z. B. über die StuI- oder BsaI-Restriktionsstelle) fusioniert werden, wodurch eine Sekreti- n des Genprodukts in das Periplasma ermöglicht wird. Andererseits kann das Strukturgen auch in die XbaI-Stelle unter gleichzeitiger Rekonstruktion der zweiten Translationsinitiationsstelle für eine Expression ins Cytoplasma inseriert werden.

Fig. 2a zeigt die Nukleotidsequenz des vollständigen regulatorischen Bereichs auf pASK75, beginnend mit

dem tetA-Promotor, bei dem die "−35" und "−10" Konsensussequenzen sowie die Startstelle der Transkription zu erkennen sind. Die den zwei Tetracyclin-Repressor-Bindestellen im Promotorbereich entsprechenden palindromen Muster in der Promotorregion und die Terminatorstruktur sind durch offene Klammern über der Nukleotidsequenz dargestellt. Die Shine-Dalgarno-Elemente sind durch Sternchen markiert.

- 5 Das Tetracyclin-Repressorgen ist auf pASK75 vom Tetracyclin-Promotor entkoppelt. Zu diesem Zweck wurde das Strukturgen des Tetracyclin-Repressors einschließlich seiner Shine Dalgarno-Sequenz direkt str. m. abwärts des konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Lactamasegens inseriert, was zu einer transkriptionalen Fusion führt.

Fig. 2b zeigt die künstliche intercistronische Region zwischen dem bla-Gen und dem tetR-Strukturgen auf pASK75. Die Shine-Dalgarno-Sequenz dem tetR-Gen ist durch Sternchen gekennzeichnet.

10

## Beispiel 2

### Genexpression

- 15 Die Eigenschaften des Tetracyclin-Expressionssystems wurden am Beispiel der Sekretion von Antikörperfragmenten in E.coli untersucht. Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pASK85-D1.3 verwendet, das die Strukturgene für die zwei Polypeptidketten eines Fab-Antikörperfragments mit den variablen Domänen des Anti-Lysozym-Antikörpers D1.3 (Boulot et al., J. Mol. Biol. 213 (1990), 617–619) enthält. Sowohl das Gen für die schwere Kette als auch das Gen für die leichte Kette befinden sich jeweils unter Vorschaltung eines bakteriellen
- 20 Signalpeptids (OmpA, PhoA) unter der gemeinsamen transkriptionalen Kontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators. Das Expressionsplasmid pASK85-D1.3 wurde aus dem Basisvektor pASK75 unter Verwendung des Plasmids pASK84-D1.3 (Skerra, Gene 141 (1994), 79–84) hergestellt. Fig. 3 zeigt eine schematische Darstellung des Plasmids pASK85-D1.3. OmpA-VH-CH1-his6 ist ein Bereich, der für ein Fusionspolypeptid, bestehend aus einem OmpA-Signalpeptid, dem Fragment der schweren Antikörperkette und einer C-terminalen His<sub>6</sub>-Sequenz kodiert. PhoA-VK-CK ist ein Bereich, der für ein Fusionspolypeptid, bestehend aus einem PhoA-Signalpeptid
- 25 und dem Fragment der leichten Antikörperkette, kodiert. Die anderen genetischen Elemente besitzen die gleiche Bedeutung wie in Fig. 1b angegeben.

- In Fig. 4a ist in einem Western Blot des Gesamtzellproteins der Zeitverlauf einer Induktion der Antikörperfragmentsynthese durch pASK85-D1.3 gezeigt. Die Anfärbung der Blots erfolgte unter Verwendung kommerzieller Antiseren (Kaninchen-Anti-Maus-Ig und Schwein-Anti-Kaninchen-Ig-alkalische Phosphatase-Konjugat, 30 Dako, Hamburg, BRD) und der Farbstoffe Nitroblau-Tetrazolium (Sigma, Deisenhofen, BRD) und 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, Toluidinsalz (Boehringer Mannheim GmbH, BRD) nach Standardmethoden (Sambrook et al. (1989), supra). Die Zellen wurden zuvor bei 22°C bis zur mittleren Logphase kultiviert und dann wurde der Promotor durch Zugabe von 200 µg Anhydrotetracyclin pro Liter Medium induziert. Eine Stunde
- 35 danach konnten beide Ketten des Fab-Fragments deutlich nachgewiesen werden. Ihre Menge stieg im Verlauf der Induktionszeit (4 h) stetig an und nahm sogar während weiterer Inkubation über Nacht noch zu. Ein Vergleich mit dem gereinigten rekombinanten Fab-Fragment zeigte, daß beide Fab-Vorläufer quantitativ prozessiert waren. Eine Abschätzung ergab, daß nach 3 bis 4 h Induktion etwa 20 mg/l Ig-Protein synthetisiert worden waren.

- 40 Spur 0 von Fig. 4a zeigt eine unmittelbar vor der Induktion entnommene Probe. Die Spuren 1 bis 4 zeigen Proben von 1 bis 4 h nach der Induktion, Spur 5 zeigt eine Probe nach einer Inkubation über Nacht, Spur M zeigt ca. 1 µg gereinigtes rekombinantes Fab-Fragment. LC und HC bedeuten die jeweils leichte bzw. schwere Kette des Ig-Fragments.

- Ein Vergleich der Expression des Ig-Proteins durch das erfindungsgemäße Plasmid pASK85-D1.3 mit dem 45 lac-Promotorplasmid pASK84-D1.3 (Skerra (1994), supra) unter Verwendung von E.coli K12-JM83 (Yanisch-Perron et al., Gene 33 (1985), 103–119) als Wirtstamm zeigte, daß die bei dem tetA-Promotor erhaltene Ausbeute gleich wie bei dem lacUV5-Promotor war. Auch der Zeitverlauf der Expression und die Gesamtmenge an synthetisiertem Protein waren bei beiden Systemen im wesentlichen gleich. Im Falle des lacUV5-Plasmids konnten jedoch geringe Mengen des Fab-Fragments auch in Abwesenheit des Induktors IPTG nachgewiesen werden.

- 50 Aufgrund der toxischen Wirkung bei der Sekretion eines Ig-Fragments in E.coli kann das Ausmaß der Repression in einem Promotorsystem auf qualitative Weise anhand der Lebensfähigkeit und des Wachstumsverhaltens der transformierten Bakterien bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Wirtsstämme mit pASK85-D1.3 transformiert. Im Gegensatz zu dem lacUV5-Promotorplasmid pASK84-D1.3 konnten keine
- 55 Anzeichen von Toxizität, z. B. das Auftreten von Satellitenkolonien auf Ampicillin-Agarplatten oder die Lyse von Übernachtskulturen, bei Verwendung zahlreicher verschiedener E.coli-Stämme gefunden werden. Weiterhin waren die Zelldichten von Übernachtskulturen (bei 37°C) unter Verwendung des Tetracyclin-Promotorplasmids reproduzierbar höher, und die Plasmidpräparationen ergaben durchgehend gute Ausbeuten. Auch die Herstellung großer Mengen von einzelsträngiger Phagemid-DNA war aus den tet-Promotorvektoren mit Standardmethoden möglich, was ein weiteres Anzeichen für die effiziente Repression des Fremdgens darstellt.

- 60 Fig. 4b zeigt das Ergebnis von Experimenten zur Expression des rekombinanten Fab-Fragments in verschiedenen E. coli-Wirtsstämmen der Klassen K12 oder B.

- Der Nachweis von rekombinanten Fab-Fragmenten in Fig. 4b erfolgte mittels eines Western Blots des gesamten E.coli-Zellproteins 3 h nach der Induktion wie in Fig. 4a. Spur 1: JM83 (Yanisch-Perron et al. (1985) supra), 65 Spur 2: WK6 (Zell und Fritz, EMBO J. 6 (1987), 1809–1815), Spur 3: E.coli B (ATCC 11303), Spur 4: BL21 (Studier und Moffat (1986), J. Mol. Biol. 189 (1986), 113–130), Spur 5: MG1655 (Jensen, J. Bacteriol. 175 (1993), 3401–3407); Spur 6: W3110 (Jensen (1993), supra); Spur 7: W3110 in Glucose-Minimalmedium, Spur 8: XL1-Blue (Bullock et al., Biotechniques 5 (1987), 376–379); Spur M: ca. 1 µg gereinigtes rekombinantes Fab-Fragment.

Fig. 4b zeigt, daß nahezu identische Mengen des rekombinanten Fab-Fragments unabhängig vom E. coli-Wirtstamm synthetisiert wurden. Eine volle Induktion des Promotors wurde in diesem System mit 100 oder 200 µg/l Anhydrotetracyclin gefunden. Unter diesen Bedingungen wurden beide Ketten des rekombinanten Fab-Fragments quantitativ prozessiert und auch in das Periplasma sekretiert. Weiterhin ist festzustellen, daß die Expression des rekombinanten Fab-Fragments weder durch Vorhandensein einer episomalen Kopie des Tn10-Tetracyclin-Resistenzgens (Stamm E. coli XL1-Blue) oder bei Kultivierung in einem Glucose-Minimalmedium beeinträchtigt wurde.

### Beispiel 3

#### Genexpression in einem 4 l-Fermenter

Die Verwendung von Minimalmedien mit definierter Zusammensetzung stellt besonders günstige Voraussetzungen für die Kultivierung der transformierten Bakterienzellen bis zu hoher Zelldichte im Fermenter dar (Riesenberg, Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 380–384). Zu diesem Zweck ist es wünschenswert, mit einem Bakterienstamm zu arbeiten, der keine Auxotrophien aufweist. Die Eigenschaft des erfindungsgemäßen Promotorsystems, weitgehend unabhängig vom Nährmedium sowie den Charakteristika des E. coli-Stamms zu funktionieren, ist in diesem Zusammenhang besonders vorteilhaft.

Die Produktion des künstlichen Antikörper-Fab-Fragments M41 wurde in einem 4-Liter-Fermenter in Gegenwart eines Glucose-Minimalmediums (Sambrook et al, supra), dem Mineralsalze und 100 mg pro Liter Ampicillin zur Selektion auf das Expressionsplasmid zugesetzt waren, untersucht. Das verwendete Expressionsplasmid pASK85-M41 war analog zum Plasmid pASK85-D13 aufgebaut, wobei die variablen Domänen des kodierten Antikörper-Fab-Fragments eine andere Sequenz aufwiesen. Durch Plattieren von Proben auf Agar-Kulturplatten in Gegenwart und Abwesenheit von Ampicillin wurde nachgewiesen, daß auch bei hoher Zelldichte kein Verlust des Expressionsplasmids in der Kultur auftrat. Wenn die Genexpression bei einer Zelldichte OD(550) = 10 durch Zugabe von 0,5 mg pro Liter Anhydrotetracyclin 3 h induziert wurde, wurden, bezogen auf die Zellmasse, vergleichbare Ausbeuten des rekombinanten Proteins erhalten wie bei Kultivierung im Schüttelkolben in Gegenwart eines Vollmediums.

SEQ ID NO. 1:

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

LÄNGE: 83 Basenpaare

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Plasmid-DNA

BEZEICHNUNG: Tetracyclin-Regulationssequenz

BESCHREIBUNG ZU SEQ ID NO. 1:

ATTAATTCCT AATTTTGTGTT GACACTCTAT CATTGATAGA GTTATTTTAC CACTCCCTAT

CAGTGATAGA GAAAAGTGAA ATG

# DE 44 17 598 A1

SEQ ID NO. 2:

ART DER SEQUENZ: Nucleotid

LÄNGE: 3266 Basenpaare

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: zirkulär

ART DES MOLEKÜLS: Plasmid

BEZEICHNUNG: pASK 75

BESCHREIBUNG ZU SEQ ID NO. 2:

ACCCGACACC ATCGAATGGC CAGATGATTA ATTCCTAATT TTTGTTGACA CTCTATCATT	60
GATAGAGTTA TTTTACCACT CCCTATCAGT GATAGAGAAA AGTGAAATGA ATAGTTCGAC	120
AAAAATCTAG ATAACGAGGG CAAAAAATGA AAAAGACAGC TATCGCGATT GCAGTGGCAC	180
TGGCTGGTTT CGCTACCGTA GCGCAGGCCT GAGACCAGAA TTCGAGCTCG GTACCCGGGG	240
ATCCCTCGAG GTCGACCTGC AGGCAGCGCT TGGCGTCACC CGCAGTTCGG TGGTTAATAA	300
GCTTGACCTG TGAAGTGAAA AATGGCGCAC ATTGTGCGAC ATTTTTTTTG TCTGCCGTTT	360
ACCGCTACTG CGTCACGGAT CTCCACGCGC CCTGTAGCGG CGCATTAAAGC GCGGCGGGTG	420
TGGTGGTTAC GCGCAGCGTG ACCGCTACAC TTGCCAGCGC CCTAGCGCCC GCTCCTTTTCG	480
CTTTCTTCCC TTCCTTTCTC GCCACGTTTCG CCGGCTTTCC CCGTCAAGCT CTAAATCGGG	540
GGCTCCCTTT AGGGTTCCGA TTTAGTGCTT TACGGCACCT CGACCCCAA AACTTGATT	600
AGGGTGATGG TTCACGTAGT GGGCCATCGC CCTGATAGAC GGTTTTTCGC CCTTTGACGT	660
TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT AGTGGACTCT TGTTCCAAAC TGGAACAACA CTCAACCCTA	720
TCTCGGTCTA TTCTTTTGAT TTATAAGGGA TTTTGCCGAT TTCGGCCTAT TGGTTAAAAA	780
ATGAGCTGAT TTAACAAAAA TTTAACGCGA ATTTTAACAA AATATTAACG TTTACAATTT	840
CAGGTGGCAC TTTTCGGGGA AATGTGCGCG GAACCCCTAT TTGTTTATTT TTCTAAATAC	900
ATTCAAATAT GSTATCGCTC ATGAGACAAT AACCCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA	960
AAAGGAAGAG TATGAGTATT CAACATTTCC GTGTGCGCCT TATTCCTTT TTTGCGGCAT	1020

# DE 44 17 598 A1

TTTGCCTTCC TGTTTTGTCT CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC	1080	
AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG ATCCTTGAGA	1140	5
GTTTTGCCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT TAAAGTTCTG CTATGTGGCG	1200	
CGGTATTATC CCGTATTGAC GCCGGGCAAG AGCAACTCGG TCGCCGCATA CACTATTCTC	1260	10
AGAATGACTT GGTGAGTAC TCACCAGTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG	1320	
TAAGAGAATT ATGCAGTGCT GCCATAACCA TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC	1380	15
TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG GGGGATCATG	1440	20
TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC CATACCAAAC GACGAGCGTG	1500	
ACACCACGAT GCCTGTAGCA ATGGCAACAA CGTTGCGCAA ACTATTAACT GGCGAACTAC	1560	25
TTACTCTAGC TTCCCGGCAA CAATTyATAG ACTGGATGGA GGCGGATAAA GTTGCAGGAC	1620	
CACTTCTGCG CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGTTTATTGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG	1680	30
AGCGTGGCTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC TCCCGTATCG	1740	
TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA ACGAAATAGA CAGATCGCTG	1800	35
AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT AGGAATTAAT GATGTCTCGT TTAGATAAAA	1860	40
GTAAAGTGAT TAACAGCGCA TTAGAGCTGC TTAATGAGGT CGGAATCGAA GGTTTAACAA	1920	
CCCGTAAACT CGCCCAGAAG CTAGGTGTAG AGCAGCCTAC ATTGTATTGG CATGTAAAAA	1980	45
ATAAGCGGGC TTTGCTCGAC GCCTTAGCCA TTGAGATGTT AGATAGGCAC CATACTCACT	2040	
TTTGCCCTTT AGAAGGGGAA AGCTGGCAAG ATTTTTTACG TAATAACGCT AAAAGTTTTA	2100	50
GATGTGCTTT ACTAAGTCAT CGCGATGGAG CAAAAGTACA TTTAGGTACA CGGCCTACAG	2160	
AAAAACAGTA TGAACTCTC GAAAATCAAT TAGCCTTTTT ATGCCAACAA GGTTTTTCAC	2220	55
TAGAGAATGC ATTATATGCA CTCAGCGCaG TGGGGCATT TACTTTAGGT TGCGTATTGG	2280	60
AAGATCAAGA GCATCAAGTC GCTAAAGAAG AAAGGGAAAC ACCTACTACT' GATAGTATGC	2340	
CGCCATTATT ACGACAAGCT ATCGAATTAT TTGATCACCA AGGTGCAGAG CCAGCCTTCT	2400	65

# DE 44 17 598 A1

	TATTCGGCCT TGAATTGATC ATATGCGGAT TAGAAAAACA ACTTAAATGT GAAAGTGGGT	2460
	CTTAAAGCA GCATAACCTT TTTCCGTGAT GGTAAGTTCA CTAGTTTAAA AGGATCTAGG	2520
5	TGAAGATCCT TTTTGATAAT CTCATGACCA AAATCCCTTA ACGTGAGTTT TCGTTCCACT	2580
	GAGCGTCAGA CCCCCTAGAA AAGATCAAAG GATCTTCTTG AGATCCTTTT TTTCTGCGCG	2640
10	TAATCTGCTG CTTGCAAACA AAAAAACCAC CGCTACCAGC GGTGGTTTGT TTGCCGGATC	2700
	AAGAGCTACC AACTCTTTTT CCGAAGGTAA CTGGCTTCAG CAGAGCGCAG ATACCAAATA	2760
15	CTGTCCTTCT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC ACCACTTCAA GAACTCTGTA GCACCGCCTA	2820
	CATACCTCGC TCTGCTAATC CTGTTACCAG TGGCTGCTGC CAGTGGCGAT AAGTCGTGTC	2880
20	TTACCGGGTT GGACTCAAGA CGATAGTTAC CGGATAAGGC GCAGCGGTCG GGCTGAACGG	2940
25	GGGGTTTCGTG CACACAGCCC AGCTTGGAGC GAACGACCTA CACCGAACTG AGATACCTAC	3000
	AGCGTGAGCT ATGAGAAAGC GCCACGCTTC CCGAAGGGAG AAAGGCGGAC AGGTATCCGG	3060
30	TAAGCGGCAG GGTCCGAACA GGAGAGCGCA CGAGGGAGCT TCCAGGGGGA AACGCCTGGT	3120
	ATCTTTATAG TCCTGTCGGG TTTCGCCACC TCTGACTTGA GCGTCGATTT TTGTGATGCT	3180
35	CGTCAGGGGG GCGGAGCCTA TGGAAAAACG CCAGCAACGC GGCCTTTTTA CGGTTCTCTGG	3240
40	CCTTTTGCTG GCCTTTTGCT CACATG	3266

## Patentansprüche

1. Prokaryontischer Vektor, umfassend (a) eine regulierbare Expressionskontrollsequenz, die durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbar ist und (b) ein Tetracyclin-Repressor-Strukturgen in operativer Verknüpfung mit einer Expressionskontrollsequenz, die nicht durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbar ist.
2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbare Expressionskontrollsequenz die in SEQ ID NO. 1 dargestellte Nukleotidsequenz oder eine funktionelle Variante davon enthält.
3. Vektor Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbare Expressionskontrollsequenz die Basenfolgen  
5'-ACTCTATCATTGATAGAGT-3' oder/und  
5'-TCCCTATCAGTGATAGAGA-3' enthält.
4. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Tetracyclin-Repressorgen in operativer Verknüpfung mit einer konstitutiven Expressionskontrollsequenz ist.
5. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß er ein zirkuläres Plasmid ist.
6. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 5, weiterhin umfassend eine multiple Klonierungsstelle in operativer Verknüpfung mit der durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbaren Expressionskontrollsequenz.
7. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 6, weiterhin umfassend eine Signalpeptid-kodierende Sequenz in operativer Verknüpfung mit der durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbaren Expressionskontrollsequenz.
8. Vektor nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Signalpeptid-kodierende Sequenz eine OmpA- oder PhoA-Signalsequenz ist.
9. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 8, weiterhin umfassend eine Transkriptionsterminationssequenz

- in operativer Verknüpfung mit der durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbaren Expressionskontrollsequenz.
10. Vektor nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Transkriptionsterminationssequenz der Lipoprotein-Transkriptionsterminator ist.
11. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 10, weiterhin umfassend eine Affinitätspeptid-kodierende Nukleotidsequenz in operativer Verknüpfung mit der durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbaren Expressionskontrollsequenz. 5
12. Vektor nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Affinitätspeptid-kodierende Nukleotidsequenz für ein Oligo-Histidin-Peptid oder für ein Streptavidin-Bindungspeptid kodiert.
13. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 12, weiterhin umfassend mindestens ein für ein heterologes Polypeptid kodierendes Strukturgen in operativer Verknüpfung mit der durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbaren Expressionskontrollsequenz. 10
14. Vektor nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturgen für ein Polypeptid kodiert, das für eine prokaryontische Zelle toxisch ist.
15. Vektor nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen für eine Antikörperfragment-Kette oder das Serum-Retinol-Bindungsprotein kodiert. 15
16. Plasmid pASK 75 mit der in SEQ ID NO. 2 dargestellten Nukleotidsequenz.
17. Prokaryontische Zelle, enthaltend (a) ein für ein heterologes Polypeptid kodierendes Gen in operativer Verknüpfung mit einer regulierbaren Expressionskontrollsequenz, die durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbar ist, und (b) ein Tetracyclin-Repressorstrukturgen in operativer Verknüpfung mit einer Expressionskontrollsequenz, die nicht durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbar ist. 20
18. Prokaryontische Zelle nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit mindestens einer Kopie eines Vektors nach einem der Ansprüche 1 bis 16 transformiert ist.
19. Zelle nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine E.coli-Zelle ist.
20. Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 1 bis 16 oder einer Zelle nach einem der Ansprüche 17 bis 19 in einem Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Polypeptiden in Prokaryonten. 25
21. Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Polypeptiden in einer prokaryontischen Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß man
- (i) eine Zelle bereitstellt, enthaltend (a) mindestens ein für ein heterologes Polypeptid kodierendes Gen in operativer Verknüpfung mit einer regulierbaren Expressionskontrollsequenz, die durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbar ist, und (b) ein Tetracyclin-Repressorstrukturgen in operativer Verknüpfung mit einer Expressionskontrollsequenz, die nicht durch ein Tetracyclin-Repressorprotein reprimierbar ist, 30
  - (ii) die Zelle aus (i) in einem geeigneten Medium unter Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression des für das heterologe Polypeptid kodierenden Gens führen, und 35
  - (iii) das heterologe Polypeptid aus der Zelle oder dem Medium isoliert.
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Zelle verwendet, die die regulierbare Expressionskontrollsequenz und das Tetracyclin-Repressorstrukturgen auf einem einzigen Vektor enthält.
23. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Zelle verwendet, die die regulierbare Expressionskontrollsequenz und das Tetracyclin-Repressorstrukturgen auf zwei unterschiedlichen, miteinander kompatiblen Vektoren enthält. 40
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Kultivierung der Zelle in Schritt (ii) zunächst bis zum Erreichen einer vorbestimmten Zelldichte unter derartigen Bedingungen erfolgt, daß die Expression des für das heterologe Polypeptid kodierenden Gens weitgehend reprimiert ist, und daß nach Erreichen der vorbestimmten Zelldichte die Expression des Gens vollständig oder teilweise induziert wird. 45
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Induzierung durch Zugabe von Tetracyclin oder einem Tetracyclinderivat erfolgt.
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Induzierung durch Zugabe von Anhydrotetracyclin erfolgt. 50
27. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Zugabe des Induktors bis auf eine Endkonzentration von 5 bis 500 µg/l Medium erfolgt.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zelle in einem Minimalmedium kultiviert. 55

Hierzu 17 Seite(n) Zeichnungen

60

65

Figur 1a

```

      P
      f      B
      l      a
      M      l
      I      I
ACCCGACACCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCTAATTTTGTGGACTCTATCATT
1  -----+-----+-----+-----+-----+ 60
TGGGCTGTGGTAGCTTACCGGTCTACTAATTAAGGATTAACCACTGTGAGATAGTAA

a:  ThrArgHisHisArgMetAlaArgEndLeuIleProAsnPheCysEndHisSerIleIle -
b:  ProAspThrIleGluTrpProAspAspEndPheLeuIlePheValAspThrLeuSerLeu -
c:  ProThrProSerAsnGlyGlnMetIleAsnSerEndPheLeuLeuThrLeuTyrHisEnd -

GATAGAGTTATTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTCGAC
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
CTATCTCAATAAAATGGTGAGGGATAGTCACTATCTCTTTTCACTTTACTTATCAAGCTG

a:  AspArgValIleLeuProLeuProIleSerAspArgGluLysEndAsnGluEndPheAsp -
b:  IleGluLeuPheTyrHisSerLeuSerValIleGluLysSerGluMetAsnSerSerThr -
c:  EndSerTyrPheThrThrProTyrGlnEndEndArgLysValLysEndIleValArgGln -

      X
      b
      a
      I
AAAAATCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCAC
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
TTTTTAGATCTATTGCTCCCGTTTTTTTACTTTTTTCTGTGATAGCGCTAACGTCACCGTG

a:  LysAsnLeuAspAsnGluGlyLysLysEndLysArgGlnLeuSerArgLeuGlnTrpHis -
b:  LysIleEndIleThrArgAlaLysAsnGluLysAspSerTyrArgAspCysSerGlyThr -
c:  LysSerArgEndArgGlyGlnLysMetLysLysThrAlaIleAlaIleAlaValAlaLeu -

                                     E                                     B
                                     B S                                     c      S      K S  a
                                     s t                                     o      s      p m  m
                                     a u                                     R      t      n a  K
                                     I I                                     I      I      I I  I
TGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCTGAGACCAGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGG
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
ACCGACCAAAGCGATGGCATCGCGTCCGGACTCTGGTCTTAAGCTCGAGCCATGGGCCCC

```

Figur 1a/2

a: TrpLeuValSerLeuProEndArgArgProGluThrArgIleArgAlaArgTyrProGly -  
 b: GlyTrpPheArgTyrArgSerAlaGlyLeuArgProGluPheGluLeuGlyThrArgGly -  
 c: AlaGlyPheAlaThrValAlaGlnAlaEndAspGlnAsnSerSerSerValProGlyAsp -

		S	E	
		s	c	H
		e	o	i
		8	B 4	n
X	SA	P3	s 7	d
h	ac	s8	p I	I
o	lc	t7	M I	I
I	II	II	I I	I

/

ATCCCTCGAGGTCGACCTGCAGGCAGCGCTTGGCGTCACCCGAGTTCGGTGGTTAATAA  
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300  
 TAGGGAGCTCCAGCTGGACGTCCGTGCGAACCAGTGGGCGTCAAGCCACCAATTATT

a: IleProArgGlyArgProAlaGlySerAlaTrpArgHisProGlnPheGlyGlyEndEnd -  
 b: SerLeuGluValAspLeuGlnAlaAlaLeuGlyValThrArgSerSerValValAsnLys -  
 c: ProSerArgSerThrCysArgGlnArgLeuAlaSerProAlaValArgTrpLeuIleSer -

GCTTGACCTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTTGTCTGCCGTTT  
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360  
 CGAAGTGGACACTTCACTTTTTTACCGCGTGTAAACACGCTGTAAAAAAACAGACGGCAA

a: AlaEndProValLysEndLysMetAlaHisIleValArgHisPhePheCysLeuProPhe -  
 b: LeuAspLeuEndSerGluLysTrpArgThrLeuCysAspIlePhePheValCysArgLeu -  
 c: LeuThrCysGluValLysAsnGlyAlaHisCysAlaThrPhePheLeuSerAlaValTyr -

ACCGCTACTGCGTCACGGATCTCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGGGCGGGTG  
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420  
 TGGCGATGACGCAGTGCCTAGAGGTGCGCGGGACATCGCCGCGTAATTCGCGCGCCCCAC

a: ThrAlaThrAlaSerArgIleSerThrArgProValAlaAlaHisEndAlaArgArgVal -  
 b: ProLeuLeuArgHisGlySerProArgAlaLeuEndArgArgIleLysArgGlyGlyCys -  
 c: ArgTyrCysValThrAspLeuHisAlaProCysSerGlyAlaLeuSerAlaAlaGlyVal -

TGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCG  
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480  
 ACCACCAATGCGCGTGCCTAGAGGTGCGCGGGATCGCGGGATCGCGGGCGAGGAAAGC

a: TrpTrpLeuArgAlaAlaEndProLeuHisLeuProAlaProEndArgProLeuLeuSer -  
 b: GlyGlyTyrAlaGlnArgAspArgTyrThrCysGlnArgProSerAlaArgSerPheArg -

Figur 1a/ 3

c: ValValThrArgSerValThrAlaThrLeuAlaSerAlaLeuAlaProAlaProPheAla -

N

a

e

I

CTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGG  
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540  
 GAAAGAAGGGAAGGAAAGAGCGGTGCAAGCGGCCGAAAGGGGCAGTTCGAGATTTAGCCC

a: LeuSerSerLeuProPheSerProArgSerProAlaPheProValLysLeuEndIleGly -

b: PheLeuProPheLeuSerArgHisValArgArgLeuSerProSerSerSerLysSerGly -

c: PhePheProSerPheLeuAlaThrPheAlaGlyPheProArgGlnAlaLeuAsnArgGly -

GGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATT  
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600  
 CCGAGGGAAATCCCAAGGCTAAATCACGAAATGCCGTGGAGCTGGGGTTTTTTGAACTAA

a: GlySerLeuEndGlySerAspLeuValLeuTyrGlyThrSerThrProLysAsnLeuIle -

b: AlaProPheArgValProIleEndCysPheThrAlaProArgProGlnLysThrEndLeu -

c: LeuProLeuGlyPheArgPheSerAlaLeuArgHisLeuAspProLysLysLeuAspEnd -

AGGGTGATGGTTACGTTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGT  
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660  
 TCCCCTACCAAGTGCATCACCCGGTAGCGGGACTATCTGCCAAAAAGCGGGAACTGCA

a: ArgValMetValHisValValGlyHisArgProAspArgArgPhePheAlaLeuEndArg -

b: GlyEndTrpPheThrEndTrpAlaIleAlaLeuIleAspGlyPheSerProPheAspVal -

c: GlyAspGlySerArgSerGlyProSerProEndEndThrValPheArgProLeuThrLeu -

TGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTA  
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720  
 ACCTCAGGTGCAAGAAATTATCACCTGAGAACAAGGTTTGACCTTGTTGTGAGTTGGGAT

a: TrpSerProArgSerLeuIleValAspSerCysSerLysLeuGluGlnHisSerThrLeu -

b: GlyValHisValLeuEndEndTrpThrLeuValProAsnTrpAsnAsnThrGlnProTyr -

c: GluSerThrPhePheAsnSerGlyLeuLeuPheGlnThrGlyThrThrLeuAsnProIle -

TCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAAA  
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780  
 AGAGCCAGATAAGAAAATAAATATTCCTTAAACGGCTAAAGCCGGATAACCAATTTTT

a: SerArgSerIleLeuLeuIleTyrLysGlyPheCysArgPheArgProIleGlyEndLys -

b: LeuGlyLeuPhePheEndPheIleArgAspPheAlaAspPheGlyLeuLeuValLysLys -

Figur 1a/4

c: SerValTyrSerPheAspLeuEndGlyIleLeuProIleSerAlaTyrTrpLeuLysAsn -

ATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTT  
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840  
 TACTCGACTAAATTGTTTTAAATTGCGCTTAAATTTGTTTTATAATTGCAAATGTTAAA

a: MetSerEndPheAsnLysAsnLeuThrArgIleLeuThrLysTyrEndArgLeuGlnPhe -  
 b: EndAlaAspLeuThrLysIleEndArgGluPheEndGlnAsnIleAsnValTyrAsnPhe -  
 c: GluLeuIleEndGlnLysPheAsnAlaAsnPheAsnLysIleLeuThrPheThrIleSer -

CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATAC  
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900  
 GTCCACCGTGAAAAGCCCCTTTACACGCGCCTTGGGGATAAACAAATAAAAAGATTTATG

a: GlnValAlaLeuPheGlyGluMetCysAlaGluProLeuPheValTyrPheSerLysTyr -  
 b: ArgTrpHisPheSerGlyLysCysAlaArgAsnProTyrLeuPheIlePheLeuAsnThr -  
 c: GlyGlyThrPheArgGlyAsnValArgGlyThrProIleCysLeuPhePheEndIleHis -

E  
 a  
 r  
 I

ATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAATATTGAA  
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960  
 TAAGTTTATACATAGGCGAGTACTCTGTTATTGGGACTATTTACGAAGTTATTATAACTT

a: IleGlnIleCysIleArgSerEndAspAsnAsnProAspLysCysPheAsnAsnIleGlu -  
 b: PheLysTyrValSerAlaHisGluThrIleThrLeuIleAsnAlaSerIleIleLeuLys -  
 c: SerAsnMetTyrProLeuMetArgGlnEndProEndEndMetLeuGlnEndTyrEndLys -

AAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCAT  
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+1020  
 TTTCTTCTCATACTCATAAGTTGTAAAGGCACAGCGGGAATAAGGGAAAAACGCCGTA

a: LysGlyArgValEndValPheAsnIleSerValSerProLeuPheProPheLeuArgHis -  
 b: LysGluGluTyrGluTyrSerThrPheProCysArgProTyrSerLeuPheCysGlyIle -  
 c: ArgLysSerMetSerIleGlnHisPheArgValAlaLeuIleProPhePheAlaAlaPhe -

TTTGCCCTTCCTGTTTTTCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATC  
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+1080  
 AAACGGAAGGACAAAAACGAGTGGGTCTTTGCGACCACTTTCATTTTCTACGACTTCTAG

a: PheAlaPheLeuPheLeuLeuThrGlnLysArgTrpEndLysEndLysMetLeuLysIle -  
 b: LeuProSerCysPheCysSerProArgAsnAlaGlyGluSerLysArgCysEndArgSer -

Figur 1a/ 5

c: CysLeuProValPheAlaHisProGluThrLeuValLysValLysAspAlaGluAspGln -

AGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGA  
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+1140  
 TCAACCCACGTGCTCACCCAATGTAGCTTGACCTAGAGTTGTCGCCATTCTAGGAACTCT

a: SerTrpValHisGluTrpValThrSerAsnTrpIleSerThrAlaValArgSerLeuArg -  
 b: ValGlyCysThrSerGlyLeuHisArgThrGlySerGlnGlnArgEndAspProEndGlu -  
 c: LeuGlyAlaArgValGlyTyrIleGluLeuAspLeuAsnSerGlyLysIleLeuGluSer -

X

m

n

I

GTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCG  
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+1200  
 CAAAGCGGGGCTTCTTGCAAAGGTTACTACTCGTGAAAATTTCAAGACGATACACCGC

a: ValPheAlaProLysAsnValPheGlnEndEndAlaLeuLeuLysPheCysTyrValAla -  
 b: PheSerProArgArgThrPheSerAsnAspGluHisPheEndSerSerAlaMetTrpArg -  
 c: PheArgProGluGluArgPheProMetMetSerThrPheLysValLeuLeuCysGlyAla -

B

c

g

I

CGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTC  
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+1260  
 GCCATAATAGGGCATAACTGCGGCCCGTTCTCGTTGAGCCAGCGGCGTATGTGATAAGAG

a: ArgTyrTyrProValLeuThrProGlyLysSerAsnSerValAlaAlaTyrThrIleLeu -  
 b: GlyIleIleProTyrEndArgArgAlaArgAlaThrArgSerProHisThrLeuPheSer -  
 c: ValLeuSerArgIleAspAlaGlyGlnGluGlnLeuGlyArgArgIleHisTyrSerGln -

S

c

a

I

AGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAG  
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+1320  
 TCTTACTGAACCAACTCATGAGTGGTCAGTGTCTTTTCGTAGAATGCCTACCGTACTGTC

a: ArgMetThrTrpLeuSerThrHisGlnSerGlnLysSerIleLeuArgMetAlaEndGln -  
 b: GluEndLeuGlyEndValLeuThrSerHisArgLysAlaSerTyrGlyTrpHisAspSer -

Figur 1a/ 6

c: AsnAspLeuValGluTyrSerProValThrGluLysHisL uThrAspGlyMetThrVal -

G

d

i

I

I

TAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTC

1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+1380

ATTCTCTTAATACGTCACGACGGTATTGGTACTCACTATTGTGACGCCGGTTGAATGAAG

a: EndGluAsnTyrAlaValLeuProEndProEndValIleThrLeuArgProThrTyrPhe -

b: LysArgIleMetGlnCysCysHisAsnHisGluEndEndHisCysGlyGlnLeuThrSer -

c: ArgGluLeuCysSerAlaAlaIleThrMetSerAspAsnThrAlaAlaAsnLeuLeuLeu -

P

v

u

I

TGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATG

1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+1440

ACTGTTGCTAGCCTCCTGGCTTCCTCGATTGGCGAAAAAACGTGTTGTACCCCTAGTAC

a: EndGlnArgSerGluAspArgArgSerEndProLeuPheCysThrThrTrpGlyIleMet -

b: AspAsnAspArgArgThrGluGlyAlaAsnArgPhePheAlaGlnHisGlyGlySerCys -

c: ThrThrIleGlyGlyProLysGluLeuThrAlaPheLeuHisAsnMetGlyAspHisVal -

TAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTG

1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+1500

ATTGAGCGGAAGTAGCAACCCTTGGCCTCGACTTACTTCGGTATGGTTTGCTGCTCGCAC

a: EndLeuAlaLeuIleValGlyAsnArgSerEndMetLysProTyrGlnThrThrSerVal -

b: AsnSerProEndSerLeuGlyThrGlyAlaGluEndSerHisThrLysArgArgAlaEnd -

c: ThrArgLeuAspArgTrpGluProGluLeuAsnGluAlaIleProAsnAspGluArgAsp -

F

S

P

I

ACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTAC

1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+1560

TGTGGTGCTACGGACATCGTTACCGTTGTTGCAACGCGTTTGATAATTGACCGCTTGATG

a: ThrProArgCysLeuEndGlnTrpGlnGlnArgCysAlaAsnTyrEndLeuAlaAsnTyr -

Figur 1a/ 7

b: HisHisAspAlaCysSerAsnGlyAsnAsnValAlaGlnThrIleAsnTrpArgThrThr -  
 c: ThrThrMetProValAlaMetAlaThrThrLeuArgLysLeuLeuThrGlyGluLeuLeu -

M

u

n

I

TTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTgATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGAC  
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+1620  
 AATGAGATCGAAGGGCCGTTGTTAAcTATCTGACCTACCTCCGCCTATTTCAACGTCTCTG

a: LeuLeuEndLeuProGlyAsnAsnEndEndThrGlyTrpArgArgIleLysLeuGlnAsp -  
 b: TyrSerSerPheProAlaThrIleAspArgLeuAspGlyGlyGlyEndSerCysArgThr -  
 c: ThrLeuAlaSerArgGlnGlnLeuIleAspTrpMetGluAlaAspLysValAlaGlyPro -

B

S

l

I

CACCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG  
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+1680  
 GTGAAGACGCGAGCCGGGAAGGCCGACCGACCAATAACGACTATTTAGACCTCGGCCAC

a: HisPheCysAlaArgProPheArgLeuAlaGlyLeuLeuLeuIleAsnLeuGluProVal -  
 b: ThrSerAlaLeuGlyProSerGlyTrpLeuValTyrCysEndEndIleTrpSerArgEnd -  
 c: LeuLeuArgSerAlaLeuProAlaGlyTrpPheIleAlaAspLysSerGlyAlaGlyGlu -

P

f

l

l

l

G

0

S

8

u

I

I

AGCGTGGCTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCG  
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+1740  
 TCGCACCGAGAGCGCCATAGTAACGTCGTGACCCCGGTCTACCATTCTGGGAGGGCATAGC

a: SerValAlaLeuAlaValSerLeuGlnHisTrpGlyGlnMetValSerProProValSer -  
 b: AlaTrpLeuSerArgTyrHisCysSerThrGlyAlaArgTrpEndAlaLeuProTyrArg -  
 c: ArgGlySerArgGlyIleIleAlaAlaLeuGlyProAspGlyLysProSerArgIleVal -

Figur 1a/ 8

E  
a  
m  
1  
1  
0  
5  
I

1741 TAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+1800  
ATCAATAGATGTGCTGCCCTCAGTCCGTTGATACCTACTTGCTTTATCTGTCTAGCGAC

a: EndLeuSerThrArgArgGlyValArgGlnLeuTrpMetAsnGluIleAspArgSerLeu -  
b: SerTyrLeuHisAspGlyGluSerGlyAsnTyrGlyEndThrLysEndThrAspArgEnd -  
c: ValIleTyrThrThrGlySerGlnAlaThrMetAspGluArgAsnArgGlnIleAlaGlu -

1801 AGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAGGAATTAATGATGTCTCGTTTAGATAAAA  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+1860  
TCTATCCACGGAGTGACTAATTCGTAACCATCCTTAATTACTACAGAGCAAATCTATTTT

a: ArgEndValProHisEndLeuSerIleGlyArgAsnEndEndCysLeuValEndIleLys -  
b: AspArgCysLeuThrAspEndAlaLeuValGlyIleAsnAspValSerPheArgEndLys -  
c: IleGlyAlaSerLeuIleLysHisTrpEndGluLeuMetMetSerArgLeuAspLysSer -

1861 GTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTCGGAATCGAAGGTTTAACAA  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+1920  
CATTTCACTAATTGTCGCGTAATCTCGACGAATTACTCCAGCCTTAGCTTCCAAATTGTT

a: ValLysEndLeuThrAlaHisEndSerCysLeuMetArgSerGluSerLysValEndGln -  
b: EndSerAspEndGlnArgIleArgAlaAlaEndEndGlyArgAsnArgArgPheAsnAsn -  
c: LysValIleAsnSerAlaLeuGluLeuLeuAsnGluValGlyIleGluGlyLeuThrThr -

N  
s  
p  
I

1921 CCCGTAAACTCGCCAGAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTGTATTGGCATGTAAAAA  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+1980  
GGGCATTTGAGCGGGTCTTCGATCCACATCTCGTCGGATGTAACATAACCGTACATTTTT

a: ProValAsnSerProArgSerEndValEndSerSerLeuHisCysIleGlyMetEndLys -  
b: ProEndThrArgProGluAlaArgCysArgAlaAlaTyrIleValLeuAlaCysLysLys -  
c: ArgLysLeuAlaGlnLysLeuGlyValGluGlnProThrLeuTyrTrpHisValLysAsn -

Figur 1a/ 9

B  
P  
u  
l  
o  
I

ATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCCTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCATACTCACT  
 1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+2040  
 TATTCGCCCCGAAACGAGCTGCGGAATCGGTAACCTCTACAATCTATCCGTGGTATGAGTGA

a: IleSerGlyLeuCysSerThrProEndProLeuArgCysEndIleGlyThrIleLeuThr -  
 b: EndAlaGlyPheAlaArgArgLeuSerHisEndAspValArgEndAlaProTyrSerLeu -  
 c: LysArgAlaLeuLeuAspAlaLeuAlaIleGluMetLeuAspArgHisHisThrHisPhe -

E S  
c n  
o a  
N B  
I I

TTTGCCCTTTAGAAGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTA  
 2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+2100  
 AAACGGGAAATCTTCCCTTTTCGACCGTTCTAAAAAATGCATTATTGCGATTTTCAAAAT

a: PheAlaLeuEndLysGlyLysAlaGlyLysIlePheTyrValIleThrLeuLysValLeu -  
 b: LeuProPheArgArgGlyLysLeuAlaArgPhePheThrEndEndArgEndLysPheEnd -  
 c: CysProLeuGluGlyGluSerTrpGlnAspPheLeuArgAsnAsnAlaLysSerPheArg -

GATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTTAGGTACACGGCCTACAG  
 2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+2160  
 CTACACGAAATGATTTCAGTAGCGCTACCTCGTTTTTCATGTAAATCCATGTGCCGGATGTC

a: AspValLeuTyrEndValIleAlaMetGluGlnLysTyrIleEndValHisGlyLeuGln -  
 b: MetCysPheThrLysSerSerArgTrpSerLysSerThrPheArgTyrThrAlaTyrArg -  
 c: CysAlaLeuLeuSerHisArgAspGlyAlaLysValHisLeuGlyThrArgProThrGlu -

AAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAAGGTTTTTCAC  
 2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+2220  
 TTTTTGTCATACTTTGAGAGCTTTTAGTTAATCGGAAAAATACGGTTGTTCCAAAAAGTG

a: LysAsnSerMetLysLeuSerLysIleAsnEndProPheTyrAlaAsnLysValPheHis -  
 b: LysThrValEndAsnSerArgLysSerIleSerLeuPheMetProThrArgPhePheThr -  
 c: LysGlnTyrGluThrLeuGluAsnGlnLeuAlaPheLeuCysGlnGlnGlyPheSerLeu -

Figur 1a/10

BN  
ss  
mi  
II  
/

2221 TAGAGAATGCATTATATGCACTCAGCGCaGTGGGGCATTTTACTTTAGGTTGCGTATTGG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+2280  
ATCTCTTACGTAATATACGTGAGTCGCGtCACCCCGTAAATGAAATCCAACGCATAACC

a: EndArgMetHisTyrMetHisSerAlaGlnTrpGlyIleLeuLeuEndValAlaTyrTrp -  
b: ArgGluCysIleIleCysThrGlnArgSerGlyAlaPheTyrPheArgLeuArgIleGly -  
c: GluAsnAlaLeuTyrAlaLeuSerAlaValGlyHisPheThrLeuGlyCysValLeuGlu -

2281 AAGATCAAGAGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAGTATGC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+2340  
TTCTAGTTCTCGTAGTTCAGCGATTTCTTCTTTCCCTTGTGGATGATGACTATCATACG

a: LysIleLysSerIleLysSerLeuLysLysLysGlyLysHisLeuLeuLeuIleValCys -  
b: ArgSerArgAlaSerSerArgEndArgArgLysGlyAsnThrTyrTyrEndEndTyrAla -  
c: AspGlnGluHisGlnValAlaLysGluGluArgGluThrProThrThrAspSerMetPro -

S  
t  
y  
I

2341 CGCCATTATTACGACAAGCTATCGAATTATTTGATCACCAGGTGCAGAGCCAGCCTTCT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+2400  
GCGGTAATAATGCTGTTTCGATAGCTTAATAAACTAGTGGTTCCACGTCTCGGTCGGAAGA

a: ArgHisTyrTyrAspLysLeuSerAsnTyrLeuIleThrLysValGlnSerGlnProSer -  
b: AlaIleIleThrThrSerTyrArgIleIleEndSerProArgCysArgAlaSerLeuLeu -  
c: ProLeuLeuArgGlnAlaIleGluLeuPheAspHisGlnGlyAlaGluProAlaPheLeu -

B N  
s d  
g e  
I I

2401 TATTCGGCCTTGAATTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAACCTAAATGTGAAAGTGGGT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+2460  
ATAAGCCGGAACCTTAACCTAGTATACGCCTAATCTTTTGTGGAATTTACACTTTCACCCA

a: TyrSerAlaLeuAsnEndSerTyrAlaAspEndLysAsnAsnLeuAsnValLysValGly -  
b: IleArgProEndIleAspHisMetArgIleArgLysThrThrEndMetEndLysTrpVal -  
c: PheGlyLeuGluLeuIleIleCysGlyLeuGluLysGlnLeuLysCysGluSerGlySer -

Figur 1a/1.1

S  
P  
E  
I

CTTAAAAGCAGCATAACCTTTTTCCGTGATGGTAACTTCACTAGTTTAAAAGGATCTAGG  
 2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+2520  
 GAATTTTCGTCGTATTGGAAAAAGGCACTACCATTGAAGTGATCAAATTTTCCTAGATCC

a: LeuLysSerSerIleThrPhePheArgAspGlyAsnPheThrSerLeuLysGlySerArg -  
 b: LeuLysAlaAlaEndProPheSerValMetValThrSerLeuValEndLysAspLeuGly -  
 c: EndLysGlnHisAsnLeuPheProEndTrpEndLeuHisEndPheLysArgIleEndVal -

TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACT  
 2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+2580  
 ACTTCTAGGAAAACTATTAGAGTACTGGTTTTAGGGAATTGCACTCAAAAGCAAGGTGA

a: EndArgSerPheLeuIleIleSerEndProLysSerLeuAsnValSerPheArgSerThr -  
 b: GluAspProPheEndEndSerHisAspGlnAsnProLeuThrEndValPheValProLeu -  
 c: LysIleLeuPheAspAsnLeuMetThrLysIleProEndArgGluPheSerPheHisEnd -

GAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCG  
 2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+2640  
 CTCGCAGTCTGGGGCATCTTTTCTAGTTTCCTAGAAGAACTCTAGGAAAAAAGACGCGC

a: GluArgGlnThrProEndLysArgSerLysAspLeuLeuGluIleLeuPhePheCysAla -  
 b: SerValArgProArgArgLysAspGlnArgIlePheLeuArgSerPhePheSerAlaArg -  
 c: AlaSerAspProValGluLysIleLysGlySerSerEndAspProPhePheLeuArgVal -

H  
G  
I  
E  
I  
I

TAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATC  
 2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+2700  
 ATTAGACGACGAACGTTTGTTTTTTGGTGGCGATGGTCGCCACCAAACAAACGGCCTAG

a: EndSerAlaAlaCysLysGlnLysAsnHisArgTyrGlnArgTrpPheValCysArgIle -  
 b: AsnLeuLeuLeuAlaAsnLysLysThrThrAlaThrSerGlyGlyLeuPheAlaGlySer -  
 c: IleCysCysLeuGlnThrLysLysProProLeuProAlaValValCysLeuProAspGln -

Figur 1a/12

```

AAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATA
2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+2760
TTCTCGATGGTTGAGAAAAAGGCTTCCATTGACCGAAGTCGTCTCGCGTCTATGGTTTAT

a:  LysSerTyrGlnLeuPhePheArgArgEndLeuAlaSerAlaGluArgArgTyrGlnIle  -
b:  ArgAlaThrAsnSerPheSerGluGlyAsnTrpLeuGlnGlnSerAlaAspThrLysTyr  -
c:  GluLeuProThrLeuPheProLysValThrGlyPheSerArgAlaGlnIleProAsnThr  -

CTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTA
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+2820
GACAGGAAGATCACATCGGCATCAATCCGGTGGTGAAGTTCTTGAGACATCGTGGCGGAT

a:  LeuSerPheEndCysSerArgSerEndAlaThrThrSerArgThrLeuEndHisArgLeu  -
b:  CysProSerSerValAlaValValArgProProLeuGlnGluLeuCysSerThrAlaTyr  -
c:  ValLeuLeuValEndProEndLeuGlyHisHisPheLysAsnSerValAlaProProThr  -

A
l
w
N
I

CATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTC
2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+2880
GTATGGAGCGAGACGATTAGGACAATGGTCACCGACGACGGTCACCGCTATTTCAGCACAG

a:  HisThrSerLeuCysEndSerCysTyrGlnTrpLeuLeuProValAlaIleSerArgVal  -
b:  IleProArgSerAlaAsnProValThrSerGlyCysCysGlnTrpArgEndValValSer  -
c:  TyrLeuAlaLeuLeuIleLeuLeuProValAlaAlaAlaSerGlyAspLysSerCysLeu  -

TTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGG
2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+2940
AATGGCCCAACCTGAGTTCTGCTATCAATGGCCTATTCCGCGTCGCCAGCCCGACTTGCC

a:  LeuProGlyTrpThrGlnAspAspSerTyrArgIleArgArgSerGlyArgAlaGluArg  -
b:  TyrArgValGlyLeuLysThrIleValThrGlyEndGlyAlaAlaValGlyLeuAsnGly  -
c:  ThrGlyLeuAspSerArgArgEndLeuProAspLysAlaGlnArgSerGlyEndThrGly  -

GGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTAC
2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+3000
CCCCAAGCACGTGTGTCGGGTGCAACCTCGCTTGCTGGATGTGGCTTGACTCTATGGATG

a:  GlyValArgAlaHisSerProAlaTrpSerGluArgProThrProAsnEndAspThrTyr  -
b:  GlyPheValHisThrAlaGlnLeuGlyAlaAsnAspLeuHisArgThrGluIleProThr  -
c:  GlySerCysThrGlnProSerLeuGluArgThrThrTyrThrGluLeuArgTyrLeuGln  -

```

Figur 1a/13

```

AGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGG
3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+3060
TCGCACTCGATACTCTTTCGCGGTGCGAAGGGCTTCCCTCTTTCGCGCTGTCCATAGGCC

a:   SerValSerTyrGluLysAlaProArgPheProLysGlyGluArgArgThrGlyIleArg -
b:   AlaEndAlaMetArgLysArgHisAlaSerArgArgGluLysGlyGlyGlnValSerGly -
c:   ArgGluLeuEndGluSerAlaThrLeuProGluGlyArgLysAlaAspArgTyrProVal -

TAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAAACGCCTGGT
3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+3120
ATTCGCGCTCCAGCCTTGTCCTCTCGCGTGCTCCCTCGAAGGTCCCCCTTTGCGGACCA

a:   EndAlaAlaGlySerGluGlnGluSerAlaArgGlySerPheGlnGlyGluThrProGly -
b:   LysArgGlnGlyArgAsnArgArgAlaHisGluGlyAlaSerArgGlyLysArgLeuVal -
c:   SerGlyArgValGlyThrGlyGluArgThrArgGluLeuProGlyGlyAsnAlaTrpTyr -

ATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCT
3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+3180
TAGAAATATCAGGACAGCCCAAAGCGGTGGAGACTGAACTCGCAGCTAAAAACACTACGA

a:   IlePheIleValLeuSerGlyPheAlaThrSerAspLeuSerValAspPheCysAspAla -
b:   SerLeuEndSerCysArgValSerProProLeuThrEndAlaSerIlePheValMetLeu -
c:   LeuTyrSerProValGlyPheArgHisLeuEndLeuGluArgArgPheLeuEndCysSer -

CGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGG
3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+3240
GCAGTCCCCCGCCTCGGATACCTTTTTCGCGGTGCTTGCGCCGGAAAAATGCCAAGGACC

a:   ArgGlnGlyGlyGlyAlaTyrGlyLysThrProAlaThrArgProPheTyrGlySerTrp -
b:   ValArgGlyAlaGluProMetGluLysArgGlnGlnArgGlyLeuPheThrValProGly -
c:   SerGlyGlyArgSerLeuTrpLysAsnAlaSerAsnAlaAlaPheLeuArgPheLeuAla -

CCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATG
3241 -----+-----+----- 3266
GGAAAAACGACCGGAAAAACGAGTGTAC

a:   ProPheAlaGlyLeuLeuLeuThr -
b:   LeuLeuLeuAlaPheCysSerHis -
c:   PheCysTrpProPheAlaHisMet -

```

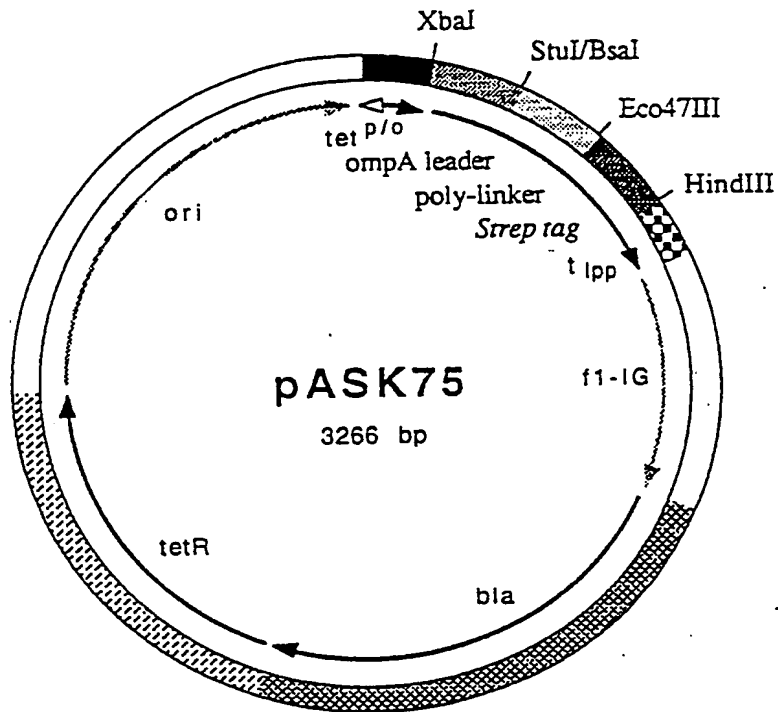


Fig. 1b



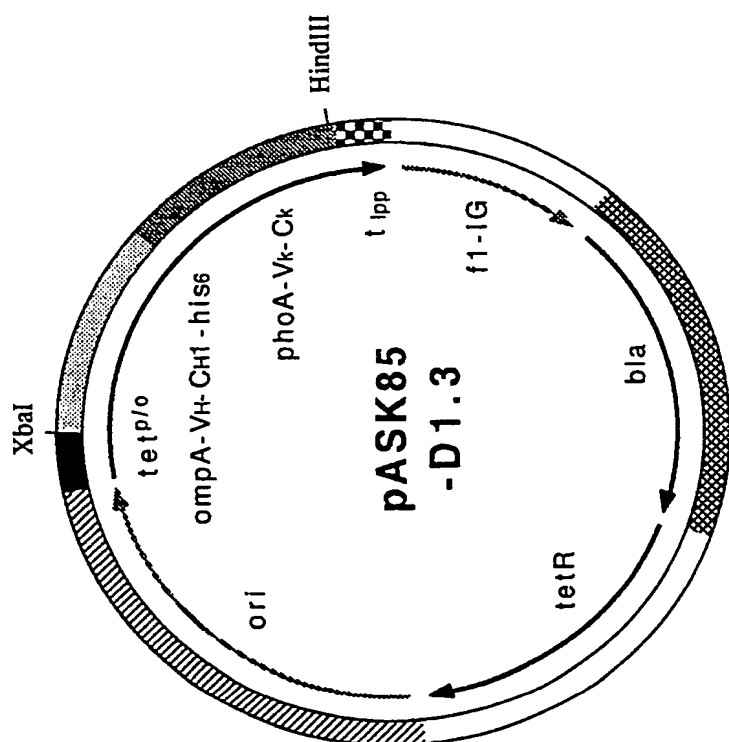


Fig. 3

Nummer:  
Int. Cl.<sup>6</sup>:  
Offenlegungstag:

DE 44 17 598 A1  
C 12 N 15/70  
14. Dezember 1995

a M 0 1 2 3 4 5      b M 1 2 3 4 5 6 7 8



Fig. 4